

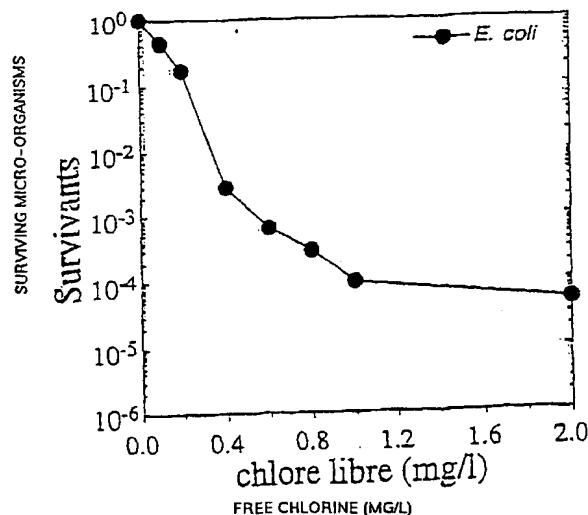


DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12Q 1/22, 1/04		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/16896 (43) Date de publication internationale: 8 avril 1999 (08.04.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR98/02045 (22) Date de dépôt international: 23 septembre 1998 (23.09.98) (30) Données relatives à la priorité: 97/12082 29 septembre 1997 (29.09.97) FR		(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): SUEZ LYONNAISE DES EAUX [FR/FR]; 72, avenue de la Liberté, F-92753 Nanterre Cedex (FR).		Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</i>	
(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): LEVI, Yves [FR/FR]; 13, avenue Chateaubriand, F-78250 Mézy sur Seine (FR). TOUATI, Danièle [FR/FR]; 7, rue de l'Epée de Bois, F-75005 Paris (FR). DUKAN, Sam [FR/FR]; 2, rue du Gerfaut, F-95800 Cergy Saint Christophe (FR).			
(74) Mandataires: ARMENGAUD, Alain etc.; Cabinet Armengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: METHOD FOR ADJUSTING AND DISINFECTING LIQUIDS

(54) Titre: PROCEDE DE REGULATION DE LA DESINFECTION DE LIQUIDES



(57) Abstract

The invention concerns a method for adjusting and disinfecting a liquid comprising measuring the proportion of surviving micro-organisms and adjusting, according to said proportion, the type and/or doses of the chemical or physical agent(s) used for said disinfection. The method provides in particular the advantage of being fast and can be easily automated.

(57) Abrégé

La présente invention est relative à un procédé de régulation de la désinfection d'un liquide comprenant la mesure du taux de microorganismes survivants et l'ajustement, en fonction dudit taux, de la nature et/ou des doses du (des) agent(s) chimique(s) ou physique(s) utilisé(s) pour ladite désinfection. Le procédé selon l'invention présente notamment l'avantage d'être rapide et aisément automatisable.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		

TITRE

"Procédé de régulation de la désinfection de liquides"

10 La présente invention est, de manière générale, relative à des moyens pour la régulation de la désinfection de liquides. Elle concerne plus particulièrement des moyens de régulation mettant en oeuvre la mesure d'activités enzymatiques.

15

La garantie de qualité et d'innocuité de liquides destinés à être en contact avec un homme ou un animal, tels qu'une eau destinée à la consommation, un liquide alimentaire, une eau de baignade, une eau destinée à des préparations pharmaceutiques ou biotechnologiques, dépend 20 directement de la fiabilité et de la sensibilité des techniques employées pour mesurer le nombre de microorganismes survivants dans ledit liquide.

Les méthodes actuellement employées pour la régulation de la désinfection d'un liquide utilisent les 25 techniques de culture sur gélose et/ou les techniques de microscopies.

Les techniques de culture sur gélose consistent à compter le nombre de colonies bactériennes se développant 30 sur différents milieux nutritifs gélosés normalisés (e.g. norme française NF T 90-414, Essais des Eaux, Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes

thermotolérants). Ces techniques présentent plusieurs inconvénients.

On peut en premier lieu citer le fait qu'elles ne donnent leurs résultats qu'au bout de 24 heures en 5 moyenne, ce qui diffère d'autant l'éventuel ajustement du procédé de désinfection.

Les techniques de culture sur gélose contraignent, de plus, à la réalisation de batteries de cultures microbiologiques pour l'analyse de chaque échantillon de 10 liquide. En effet, toutes les familles microbiennes, et bactériennes en particulier, ne se développent pas sur le même milieu nutritif ; ainsi, on peut ne détecter aucun coliforme après culture sur le milieu nutritif normalisé pour la détection des coliformes, mais trouver bon nombre 15 d'autres bactéries après culture sur d'autres milieux nutritifs. Le choix des milieux nutritifs gélosés détermine donc la qualité de l'analyse. Ce choix est d'autant plus délicat qu'il a parfois été observé un nombre plus important de colonies après culture sur un 20 milieu autre que le milieu nutritif normalisé pour la détection de ces mêmes colonies. Il a par exemple été démontré que les dénombremens de la flore bactérienne aérobiose revivifiable étaient plus importants sur milieu gélosé R2A que sur le milieu nutritif normalisé 25 correspondant (voir par exemple "A new rapid medium for enumeration and subculture of bacteria from potable water" de Reasoner D.J. et Godreich E.F., App. Environm. Microbiol. (1985) 49-p.1-7). Pour établir un diagnostic négatif fiable, les techniques de culture sur gélose 30 appellent donc à une multiplication des analyses. Les techniques de culture sur gélose ne permettent de plus pas aisément d'automatiser la régulation du procédé de désinfection.

Les bactéries sont de plus capables, et en particulier à la suite d'un stress environnemental tel que l'application d'un procédé de désinfection, d'adopter une forme de résistance sous laquelle elles ne se 5 multiplient plus tout en assurant un métabolisme minimal ; dès restauration de conditions environnementales plus favorables, ces bactéries pourraient reprendre leur multiplication. De telles bactéries sont dites "non cultivables mais viables" : elles ne sont pas détectables 10 par les techniques de culture sur gélose classiques et peuvent représenter un risque biologique pour le consommateur.

Une méthode actuellement disponible pour contrôler de manière quasi-certaine l'efficacité de la désinfection 15 d'un liquide utilise des techniques de microscopies associées à des colorations spécifiques. Cette méthode permet une discrimination entre bactéries cultivables, bactéries non cultivables mais viables et bactéries mortes. Elle nécessite cependant la mise en oeuvre de 20 plusieurs tests de colorations pour chaque échantillon et est techniquement difficilement automatisable.

La présente invention vise à pallier les inconvénients des techniques de l'art antérieur et 25 propose un procédé de régulation de la désinfection d'un liquide, caractérisé en ce qu'il comprend :

A. à une étape de ladite désinfection ci-après désignée étape 2, la mesure de l'activité d'au moins une enzyme par mise en contact des microorganismes 30 éventuellement présents dans ledit liquide avec un substrat choisi comme étant capable de révéler l'activité de cette ou ces enzyme(s), notamment par transformation dudit substrat en composés colorés, fluorescents ou luminescents ou par disparition dudit substrat, cette

activité enzymatique étant ci-après nommée activité propre,

5 B à une étape ci-après désignée étape 1, antérieure à ladite étape 2, la mesure de l'activité de la ou des même(s) enzyme(s) qu'en A, cette activité étant ci-après désignée activité initiale,

10 C. la traduction, pour chaque enzyme, desdites activité propre et activité initiale, en taux de microorganismes survivants dans le ledit liquide à l'étape 2 de ladite désinfection, et cela par l'intermédiaire d'un système de référence, pré-établi à l'aide d'un échantillon dudit liquide prélevé à ladite étape 1 puis exposé à des doses de désinfectant(s) croissantes, ainsi que

15 D. l'ajustement, en fonction dudit taux de microorganismes survivants, de la nature et/ou des doses du (des) agent(s) chimique(s) ou physique(s) utilisé(s) pour ladite désinfection.

20 Par microorganismes survivants, nous entendons dans la présente demande microorganismes cultivables et/ou microorganismes non cultivables mais viables.

25 Par taux de microorganismes survivants, nous entendons dans la présente demande le rapport entre concentration en microorganismes survivants dans ledit liquide à ladite étape 2 de désinfection et la concentration en microorganismes survivants dans le même liquide à ladite étape 1. Ce taux de microorganismes survivants est préférentiellement exprimé en valeurs 30 d'abattement sous la forme de puissances négatives de 10, ou en log d'abattement qui correspond à $- \log_{10}$ (abattement).

Ladite étape 1 peut, par exemple, correspondre à une étape "avant désinfection" dudit liquide et ladite étape

2 à une étape quelconque du procédé de désinfection, (étapes "après désinfection" dudit liquide y compris).

Le procédé selon l'invention s'adresse à des liquides dans lesquels les microorganismes éventuellement 5 présents sont soumis à des conditions tout-à-fait particulières, à savoir des conditions de désinfection, induisant un stress notable des cellules.

Le procédé de la régulation de la désinfection d'un 10 liquide selon l'invention s'adresse particulièrement aux liquides destinés à être mis en contact avec un homme ou un animal, que cela soit par simple contact, absorption, ingestion, instillation ou injection. Il s'applique particulièrement à des liquides destinés à être en 15 contact avec un homme ou un animal tel qu'une eau de baignade, une eau destinée à la consommation, une eau destinée à des préparations pharmaceutiques ou biotechnologiques, ou un liquide alimentaire.

20 Ladite mise en contact des microorganismes éventuellement présents dans ledit liquide avec ledit substrat peut être réalisée par mise en contact directe dudit liquide ou d'un échantillon dudit liquide avec ledit substrat, ou bien par mise en contact d'un 25 concentré desdits microorganismes éventuellement présents tel que filtrat, ou culot de centrifugation, dudit liquide ou échantillon de liquide, avec ledit substrat.

Préalablement à la mesure de l'activité de certaines 30 enzymes telles que la glucose-6-phosphate déshydrogénase ou la glutathion réductase, le procédé selon l'invention comprend, de manière avantageuse, l'étape de faire subir audit liquide, échantillon de liquide, ou concentré, un traitement de lyse, notamment par sonication.

Préalablement à la mesure de l'activité d'autres enzymes telles que catalase ou superoxyde dismutase, l'étape de lyse préalable peut être évitée : l'activité de ces enzymes peut être mesurée à l'aide d'un substrat diffusant à l'intérieur des microorganismes, tel que la lucigénine et le peroxyde d'hydrogène.

Selon un aspect avantageux de l'invention, la ou les enzyme(s) dont la (ou les) activité(s) est (sont) mesurée(s) présente (ent), dans ledit liquide, échantillon de liquide, ou concentré, un rapport entre activité propre et activité initiale en relation affine, et avec une pente significative différente de zéro, préférentiellement inférieure à -0,2, avec le taux de microorganismes survivants sur au moins une zone de valeurs desdits taux de microorganismes survivants. C'est par exemple le cas de la glucose-6-phosphate déshydrogénase pour des log d'abattement compris entre 0 et 3 environ, de la glutathion réductase pour des log d'abattement compris entre 4 et 7 environ, de la superoxyde dismutase pour des log d'abattement compris entre 3 et 6 environ.

D'autres enzymes d'intérêt peuvent notamment faire partie de la famille des déshydrogénases ou de la famille des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydant.

Pour déterminer si une (ou des) enzyme(s) est (sont) appropriée(s) à la mise en oeuvre de la méthode de régulation selon l'invention sur un liquide donné, il pourra être procédé comme suit :

- prélèvement d'au moins un échantillon dudit liquide et mesure de la concentration en microorganismes survivants (microorganismes cultivables et/ou microorganismes non cultivables mais viables), notamment par culture sur gélose et/ou par colorations et observations au microscope,

- dosage de l'activité de chaque enzyme candidate, sur cet ou ces échantillon(s) de liquide,
- exposition dudit (desdits) échantillon(s) de liquide à différentes doses de désinfectant(s) dans des conditions par ailleurs équivalentes (e.g. conditions de durée d'exposition, de température),
- mesure de l'activité de chaque enzyme candidate après exposition aux différentes doses de désinfectant(s),

10 - réalisation, pour chaque enzyme candidate, d'une courbe présentant les pourcentages d'activité (activité enzymatique mesurée, après exposition aux différentes doses de désinfectant(s) rapportée à l'activité enzymatique correspondante avant exposition) en fonction des log d'abattement mesurés (tels que ci-dessus définis),

- détermination, pour chaque enzyme candidate, de la zone de log d'abattement pour laquelle la pente de ladite courbe est significativement différente de zéro, préférentiellement inférieure à -0,2, cette zone constituant la gamme de réponse de l'enzyme candidate considérée sur ledit liquide,

20 - une enzyme candidate est appropriée à la mise en œuvre de la méthode selon l'invention sur ledit liquide si sa gamme de réponse comprend les valeurs de log d'abattement correspondant aux objectifs de désinfection visés pour le liquide considéré.

Selon un aspect particulièrement avantageux de l'invention, la ou au moins une des enzyme(s) dont la (ou les) activité(s) est (sont) mesurée(s) est une glucose-6-phosphate déshydrogénase, une malate déshydrogénase, une glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, une catalase, une superoxyde dismutase ou une glutathion reductase. Ladite (ou au moins une desdites) activité(s) enzymatique(s) est (sont) alors mesurée(s) par

transformation d'un substrat et le cas échéant, en présence d'un co-facteur, tel que respectivement glucose-6-phosphate et co-facteur NADP, L-malate et co-facteur NAD, glycéraldéhyde-3-phosphate et co-facteur NAD, lucigénine, peroxyde d'hydrogène, glutathion oxydé et co-facteur NADPH.

5 Selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, lesdites mesures d'activité propre et d'activité initiale sont faites à l'aide d'un appareil de 10 détection d'intensité lumineuse tel que spectrophotomètre, spectrofluoromètre, ou luminomètre, présentant éventuellement plusieurs canaux d'analyse.

15 Selon un autre mode avantageux de réalisation, de l'invention, ladite traduction en taux de microorganismes survivants à l'aide dudit système de référence pré-établi comprend, pour chaque enzyme, le calcul du rapport entre activité propre et activité initiale, éventuellement exprimé en pourcentage.

20 Selon encore un autre mode avantageux de réalisation de l'invention, ledit système de référence se présente sous une forme graphique telle qu'une ou plusieurs courbe(s) mettant, pour chaque enzyme, ledit rapport entre activité propre et activité initiale en relation avec des valeurs de taux de microorganismes survivants 25 tels que des log d'abattement. Ledit rapport entre activité propre et activité initiale est également désignée par "activité relative" dans la présente demande.

30 Selon un aspect de cet autre mode avantageux de réalisation de l'invention, lesdites mesures spectrométriques peuvent notamment être réalisées, pour chaque activité enzymatique mesurée, à température constante, notamment à 25 °C, et à longueur d'onde constante, notamment à une longueur d'onde comprise entre 35 240 et 550 nm, par exemple à 340 nm. Lesdites mesures

peuvent être enregistrées de manière continue ou discrète sur un intervalle de temps de 30 min environ. Dans le cas où l'on recherche des sensibilités de mesure plus élevées, la luminométrie est préférentiellement utilisée.

5 L'étape d'ajustement de désinfection du procédé selon l'invention peut se faire par suivi régulier de l'évolution du taux de microorganismes survivants (e.g. exprimé en abattement, log d'abattement ou indice D) à l'aide des indicateurs enzymatiques ci-avant présentés, 10 et cela jusqu'à obtention de l'objectif de désinfection fixé.

15 L'étape d'ajustement de désinfection du procédé selon l'invention peut également se faire par ajout de l'équivalent "dose de désinfectant(s)" correspondant à la différence entre le taux de microorganismes survivants visé (valeur consigne) et le taux de microorganismes effectivement mesuré sur ledit liquide, échantillon de liquide, ou concentré, à une étape de ou après désinfection.

20 Avantageusement, ledit équivalent dose de désinfectant(s) est tel que lu sur une courbe de référence représentant le taux de microorganismes cultivables en fonction de la dose de désinfectant(s) à laquelle ledit liquide est exposé.

25 L'invention donne des résultats particulièrement avantageux pour des liquides comprenant des microorganismes choisis parmi le groupe constitué notamment par le genre *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*, 30 *Klebsiella*, *Enterobacterium*, *Agrobacterium*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Salmonella*.

Le procédé de régulation de la désinfection d'un liquide selon l'invention peut, de manière particulièrement avantageuse, être facilement automatisé

sur un procédé de désinfection de liquide. Contrairement aux techniques de l'art antérieur, le procédé selon l'invention permet un contrôle microbiologique sûr, rapide et aisé à mettre en oeuvre.

5 De manière préférentielle, ledit taux de microorganismes survivants est exprimé en valeur d'abattement (concentration en microorganismes survivants rapportée à la concentration initiale en microorganismes survivants, telle que mesurée à ladite étape 1, de log d'abattement ($-\log_{10}$ (abattement)) ou d'indice D (= log d'abattement). Ledit indice D constitue également un indice de la qualité microbiologique du liquide considéré.

15 Ledit procédé de régulation de la désinfection d'un liquide selon l'invention considère, comme microorganismes survivants, ceux des microorganismes présents qui sont cultivables et/ou ceux des microorganismes présents qui ne sont pas cultivables mais qui sont viables. Dans le cas où l'on souhaite tenir compte à la fois des microorganismes cultivables et des microorganismes non cultivables mais viables, ledit système de référence met alors avantageusement, pour chaque enzyme, ledit rapport entre activité propre et activité initiale en relation avec des valeurs de taux de microorganismes survivants résultant de l'addition des valeurs de taux de microorganismes cultivables et des valeurs de taux de microorganismes non cultivables mais viables, tels que mesurés à l'aide des techniques 20 classiques.

25 Parmi lesdits agents chimiques ou physiques avantageusement utilisés pour ladite désinfection, peuvent être cités le chlore et ses dérivés, les UV,

l'ozone, H_2O_2 , les membranes filtrantes, la température, les ultra-sons, les rayonnements ionisants.

D'autres caractéristiques et avantages de la 5 présente invention apparaîtront encore à travers les exemples de réalisation suivants, donnés à titre indicatif et non limitatifs.

Lesdits exemples font référence aux figures 1, 2 et 10 3 :

La figure 1 représente le taux de bactéries *Escherichia coli* cultivables (exprimé en valeur d'abattement par rapport à la population initiale) en fonction de la concentration en chlore libre appliquée 15 (mg/l),

La figure 2 représente l'activité glucose-6-phosphate déshydrogénase (ZWF), exprimée en % de l'activité maximale mesurée, en fonction du taux de bactéries cultivables (exprimé en valeurs d'abattement 20 par rapport à la population microbienne initiale),

La figure 3 représente l'activité glutathion réductase, exprimée en % de l'activité initiale (maximale) mesurée, en fonction du taux de bactéries cultivables (exprimé en valeurs d'abattement par rapport 25 à la population microbienne maximale).

EXEMPLE 1 : Contrôle microbiologique d'une eau en désinfection destinée à la consommation humaine.

30 On cherche à déterminer si des activités enzymatiques peuvent constituer un indicateur fiable du taux de microorganismes survivants dans un liquide en

désinfection tel qu'une eau destinée à la consommation humaine.

Méthodes et Résultats

5

A ce titre, on réalise un inoculum par culture pure d'*Escherichia coli* (souche MG1655 disponible auprès de l'Institut Pasteur) sur milieu nutritif à 25 °C (milieu LB comprenant 10 g/l de tryptone Bacto, 5 g/l d'extrait de levure Bacto, 10 g/l de NaCl, pH ajusté à 7). Les bactéries sont récoltées en phase exponentielle de croissance par centrifugation puis lavées à l'aide d'un tampon phosphate (pH 7 ; 0,05 M). Les culots sont remis en suspension (environ 5.10^7 cellules/ml) dans des solutions de tampon phosphate (pH 7 ; 0,05 M) comprenant du chlore libre à différentes concentrations (de 0,0 à 2,0 mg/l). Les différentes suspensions bactériennes sont ensuite placées sous agitation à 25 °C. Au bout de 20 min, on prélève alors pour analyses des échantillons de ces suspensions bactériennes (volume de 100 à 1 000 ml par activité enzymatique à mesurer).

Pour chaque échantillon, on mesure en parallèle le taux de microorganismes survivants et différentes activités enzymatiques selon les méthodes suivantes.

25

Numération des microorganismes survivants

On compte, pour chaque échantillon de suspension bactérienne, le nombre de microorganismes qui ont survécu, i.e. le nombre de bactéries cultivables et/ou le nombre de bactéries non cultivables mais viables.

La numération des microorganismes survivants peut se faire selon des techniques classiques connues de l'homme du métier : par exemple, par étalement sur un milieu

gélosé tel qu'un milieu de TSA (Tryptic Soy Agar, Difco) pour la numération des bactéries cultivables, et par la technique du C.T.C. pour la numération des bactéries non cultivables mais viables (Schaule G., Flemming H. C. et 5 Ridgway H.F. 1993, *Use of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for quantifying planktonic and sessile bacteria in drinking water*, Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3850-3857).

A partir du nombre moyen n_i mesuré, on calcule alors 10 la concentration moyenne (C_i) en microorganismes survivants à chacune des doses i de chlore libre testée. Chaque concentration moyenne C_i en microorganismes survivants est alors exprimée relativement à la concentration maximale en microorganismes survivants 15 telle que mesurée avant désinfection (concentration maximale C_{max}). Dans le cas de la présente illustration, C_{max} correspond à la concentration moyenne en microorganismes survivants telle que mesurée en l'absence de chlore libre. Chaque C_i est ainsi traduite en valeur 20 d'abattement (ou d'élimination) à l'aide de la formule :

$$\text{abattement} = C_i / C_{max}$$

Ce taux de microorganismes survivants $\frac{C_i}{C_{max}}$ représente également une mesure de la qualité de désinfection.

25 Les résultats des numérations de microorganismes cultivables sont illustrés par la figure 1 où est reporté le taux de bactéries *E. coli* cultivables en fonction de la dose en chlore libre subie. En ordonnée de la figure 1, sont reportées les valeurs d'abattement (ou 30 d'élimination) correspondant aux concentrations en microorganismes cultivables telles qu'obtenues par

numération, et rapportées à la concentration maximale mesurée avant désinfection : 10^0 indique, une concentration en microorganismes cultivables égale à la concentration maximale mesurée ; 10^{-1} indique que la 5 concentration en microorganismes cultivables a diminué d'un facteur de 10, 10^{-2} indique que la concentration en microorganismes cultivables a diminué d'un facteur de 10^2 etc. En abscisse de la figure 1, est reportée la concentration initiale en chlore libre de la suspension 10 bactérienne correspondante. On procède à l'identique avec les résultats des numérations de microorganismes non cultivables mais viables, qui peuvent, si désiré, être additionnés aux résultats de numération des microorganismes cultivables.

15

Activités enzymatiques

Parallèlement à la numération des microorganismes survivants ci-avant décrite, sont mesurées différentes activités enzymatiques.

20 Sont ici plus particulièrement reportées les expériences relatives à deux enzymes : la glucose-6-phosphate déshydrogénase (ci-après désignée ZWF) et la glutathion réductase. Ces enzymes sont communément présentes chez de nombreux microorganismes, elles sont donc susceptibles de pouvoir représenter l'ensemble des 25 populations microbiennes présentes dans les suspensions et ainsi de donner l'image résultante de la désinfection réalisée.

30 Dans les expériences ici décrites, les bactéries en suspension sont à de trop faibles concentrations pour que leurs activités enzymatiques puissent être correctement mesurées directement sur l'échantillon liquide prélevé sans concentration préalable. Les échantillons de

suspensions sont donc ici filtrés (membrane de 0,22 µm) de manière à en récolter les microorganismes. Les microorganismes peuvent également être récoltés par centrifugation à 3 000 g pendant 10 min à 4°C.

5 Les études comparatives menées montrent qu'il est préférable de lyser les microorganismes préalablement à la mesure d'activités ZWF ou glutathion réductase. Les 10 filtres (ou culot) sont donc ici placés dans un système permettant la lyse des microorganismes récoltés : préalablement à une mesure d'activité ZWF ou glutathion réductase, la lyse des microorganismes se fait de manière préférentielle par une sonde à ultrasons (2 cycles de 30s sous ultra-sons et 30s en repos). On peut noter que, pour 15 mesurer l'activité d'enzymes autres que ZWF ou glutathion réductase, telles que e.g. catalase ou superoxyde dismutase, la lyse préalable des microorganismes peut être évitée en utilisant un substrat diffusant tel que la lucigénine et le peroxyde d'hydrogène.

20 Les différentes activités enzymatiques peuvent être mesurées selon des techniques connues de l'homme du métier. Brièvement, pour chaque activité enzymatique à mesurer, les microorganismes de chaque échantillon sont placés en contact avec un substrat choisi de manière à ce 25 que l'enzyme ciblée puisse catalyser sa transformation et à ce que cette transformation enzymatique puisse être aisément suivie par les techniques analytiques classiques telles que spectrocolorimétrie, spectrofluorométrie, ou luminométrie pour lesquelles une automatisation est 30 réalisable.

Pour mesurer une activité glucose-6-phosphate déshydrogénase, on place les microorganismes de l'échantillon en contact avec un substrat composé de

glucose-6-phosphate 0,6 mM et de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée (NADP 0,2 mM) en présence d'une solution stabilisant le pH (ajout de tampon Tris pH 7,6 MgCl₂ 10mM). Ce substrat conduit, en 5 présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase, à la formation de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH) dont on peut suivre l'apparition par spectrocolorimétrie à la longueur d'onde de 340 nm (Fraenkel D.G. et Levisohn S. R 1967, *Glucose and gluconate metabolism in an Escherichia coli mutant lacking phosphoglucose isomerase*, J. Bact 93 : 1571-1578).

10 Pour mesurer une activité glutathion réductase, on place les microorganismes de l'échantillon en contact 15 avec un substrat composé de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH 0,2 mM) et de glutathion oxydé (disulfure de glutathion GS-SG 2,5 mM) en présence d'une solution stabilisant le pH (tampon phosphate 100 mM pH 7). Sous l'action catalytique de la 20 glutathion réductase, ce substrat est transformé en nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme oxydée (NADP) et en glutathion sous forme réduite (GSH). La disparition de NADPH est alors suivie au 25 spectrocolorimètre à la longueur d'onde de 340 nm (Lopez-Barea J. et Lee C. Y. 1979, *Mouse liver glutathione reductase: purification, kinetics and regulation*, Eur. J. Biochem. 98 : 487-499).

30 Les mesures d'activités enzymatiques sont ici réalisées à une température constante identique (25 °C) à l'aide d'un spectrophotomètre PERKIN-ELMER modèle lambda 1.

La valeur de densité optique mesurée avant le démarrage de la réaction enzymatique considérée sert de

"blanc de mesure". Les valeurs de densités optiques propres de chaque milieu réactionnel sont alors enregistrées au cours du temps.

L'activité enzymatique propre de l'échantillon est ensuite calculée dans la partie linéaire de la courbe représentant la densité optique propre observée après la mise en contact du substrat avec l'enzyme ciblée (par exemple, entre 5 min et 35 min). Le calcul de la pente de la courbe "densité optique propre de l'échantillon en fonction du temps" dans l'intervalle de temps 5-35 min considéré donne une valeur de cette variation de densité optique propre.

Pour chaque enzyme, les activités enzymatiques propres mesurées aux différentes doses de désinfectants (quantité de substrat consommé ou produit par unité de temps) sont chacune exprimées en % de la valeur initiale d'activité enregistrée pour la même enzyme, *i.e.* en % de la valeur d'activité mesurée, pour la même enzyme, à la plus faible dose de désinfectant : dans la présente illustration, l'activité propre glucose-6-phosphate déshydrogénase (ZWF) et l'activité propre glutathion réductase des échantillons sont exprimées en % de l'activité propre glucose-6-phosphate déshydrogénase (ZWF) et, respectivement, glutathion réductase telle que mesurée pour les suspensions bactériennes ne comportant pas de chlore libre (*i.e.* avant désinfection). Ce rapport entre activité enzymatique propre du liquide à une étape du procédé de désinfection (*i.e.* en cours ou après désinfection) et activité enzymatique propre de ce même liquide avant désinfection est ici désigné activité enzymatique relative du liquide à ladite étape de désinfection.

Les activités enzymatiques relatives obtenues sont alors comparées aux mesures de numérations microbiologiques. Les résultats des numérations de microorganismes cultivables sont illustrés par les 5 figures 2 et 3.

La figure 2 représente, en ordonnée, l'activité glucose-6-phosphate déshydrogénase (ZWF) mesurée, exprimée en % du maximum (activité initiale) d'activité enregistré, et, en abscisse, le nombre correspondant de 10 *E. coli* cultivables obtenu par numération.

La figure 3 représente, en ordonnée, l'activité glutathion réductase mesurée, exprimée en % du maximum d'activité enregistré (activité initiale), et, en abscisse, le nombre correspondant de 15 *E. coli* cultivables obtenu par numération.

En figure 2 tout comme en figure 3, le nombre de microorganismes survivants est exprimé en fonction du log d'abattement subi selon la formule suivante :

$$\log d'abattement = - \log_{10} (C_i / C_{\max})$$

20 où C_i et C_{\max} sont tels que définis ci-avant.

Si nécessaire, les mêmes types de figures peuvent être réalisées en tenant compte des résultats des numérations de microorganismes non cultivables mais viables.

25 En figure 2 tout comme en figure 3, les valeurs de log d'abattement sont reportées sur l'axe des abscisses de la manière suivante : 1E+00 représente un nombre de microorganismes cultivables égal au nombre maximal enregistré (suspension ne présentant pas de chlore libre) 30 ; 1E-01 représente un nombre de microorganismes cultivables égal au nombre maximal enregistré diminué d'un nombre de microorganismes correspondant à une valeur de log d'abattement de 1 ; 1E-02 représente un nombre de

microorganismes cultivables égal au nombre maximal enregistré diminué d'un nombre de microorganismes correspondant à une valeur de log d'abattement de 2, et ainsi de suite jusqu'à 1E-07 qui représente un nombre de 5 microorganismes cultivables égal au nombre maximal enregistré diminué d'un nombre de microorganismes correspondant à une valeur de log d'abattement de 7.

On peut noter que cette valeur de log d'abattement constitue également un indice de la qualité 10 microbiologique du liquide considéré, indice que nous nommons D.

Les résultats obtenus montrent que le suivi de l'activité glucose-6-phosphate déshydrogénase (activité relative) est un indicateur représentatif du nombre de 15 microorganismes survivants pour une gamme d'échantillons allant des échantillons de liquide n'ayant subi aucun traitement d'élimination des microorganismes jusqu'aux échantillons de liquide présentant un log d'abattement (ou d'élimination) inférieur ou égal à 3 environ. (cf. 20 figure 2).

Les résultats obtenus montrent également que l'activité glutathion réductase (activité relative) est un indicateur représentatif du nombre de microorganismes survivants pour une gamme d'échantillons de liquide 25 présentant un log d'abattement (ou d'élimination) compris entre 4 et 7 environ. (cf. figure 3). En effet, l'activité de la glutathion réductase n'est pas significativement affectée avant que ne soient atteints 4 log d'abattement. Une proportionnalité significative 30 entre activité relative et log d'abattement n'est observée, pour cette enzyme, que sur la zone des log d'abattement compris entre 4 et 7 environ.

De manière similaire, nous avons pu démontrer que l'activité (relative) superoxyde dismutase (mesures en luminométrie à l'aide de lucigénine) est un indicateur représentatif du nombre de microorganismes survivants pour une gamme d'échantillons de liquide présentant un log d'abattement (ou d'élimination) compris entre 3 et 6 environ. Les superoxydes dismutases et les catalases présentent de plus l'avantage de ne pas nécessiter de traitement de lyse : la mesure de leur activité peut être réalisée sur un substrat diffusant tel que la lucigénine, ou respectivement le peroxyde d'hydrogène, par luminométrie.

Les différentes enzymes testées ne couvrent donc pas les mêmes domaines de sensibilité : l'activité relative de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (ZWF) est un indicateur représentatif du nombre de microorganismes survivants (log d'abattement) dans des échantillons de liquide n'ayant subi que de faibles diminutions relatives de populations microbiennes, l'activité relative de la superoxyde dismutase et de la glutathion réductase sont des indicateurs représentatifs du nombre de microorganismes survivants (log d'abattement) dans des échantillons de liquide ayant subi des diminutions relatives de populations microbiennes moyennes à fortes.

Les mêmes types de gammes de sensibilité (proportionnalité entre activité relative et log d'abattement pour certaines zones de valeurs de log d'abattement) ont pu être observés en mesurant l'activité relative de la malate déshydrogénase, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, les catalases (soit par mesure de la consommation de peroxyde d'hydrogène à 240 nm dans une solution tamponnée à pH 7 soit par chimioluminescence). L'homme du métier pourra trouver

d'autres exemples d'enzymes et de protocoles de mesure d'activités enzymatiques dans différents ouvrages de référence tels que : *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*, 1997, Cold Spring Harbor 5 Laboratory Press 0-87969-502-1/97 ; *Lehninger* 1977, *Biochimie*, Flammarion ISBN 2-257-25009-5 ; *Methods in Enzymology*, Academic Press Inc., e.g. volumes I-XLI-XLII-89-105 et 234.

10 Toute enzyme pour laquelle une proportionnalité significative (pente significative, par exemple inférieure à -0,2) entre activité relative et log d'abattement peut être mise en évidence, par exemple en suivant le protocole ci-dessus décrit, constitue un indicateur fiable selon l'invention.

15 Les mêmes types de gammes de sensibilité enzymatique peuvent être obtenus en appliquant aux suspensions de *E. coli* non pas des doses croissantes de chlore mais des doses croissantes en ozone ou des doses croissantes en UV.

20

Discussion

25 Il apparaît donc que la mesure d'activités enzymatiques permet de suivre l'évolution des populations microbiennes dans un liquide en désinfection. Ces différents indicateurs enzymatiques de survie microbienne permettent de rendre compte de la totalité des populations microbiennes : microorganismes cultivables et microorganismes non cultivables mais viables.

30 On peut par exemple suivre l'activité relative ZWF pour des log d'abattement inférieurs à 3, et l'activité relative glutathion réductase pour des log d'abattement supérieurs à 4. Dans le cas où une mesure précise d'un

log d'abattement compris entre 3 et 4 est requise, on peut alors par exemple mesurer une activité relative superoxyde dismutase.

Dans le cas où la désinfection effectuée n'a pas à 5 conduire à des log d'abattement supérieurs à 6, on peut alors soit simplement suivre l'activité relative superoxyde dismutase, qui ne commencera à répondre qu'à partir de log d'abattement supérieurs à 3, soit suivre l'activité relative ZWF jusqu'aux log d'abattement de 3, 10 puis l'activité relative superoxyde dismutase au-delà.

Les différents types d'indicateurs enzymatiques de survie microbienne ci-avant présentés permettent donc de connaître la valeur de log d'abattement du liquide 15 contrôlé, et par là même, son indice D de qualité microbiologique, sa valeur d'abattement, et le nombre de microorganismes qui y survivent. Ils donnent donc *in fine* une mesure de la vitesse et de l'efficacité du procédé de désinfection appliqué.

20 Si le nombre de microorganismes survivants dans le liquide contrôlé (e.g. exprimé sous la forme d'un log d'abattement ou indice de qualité de désinfection) ne correspond pas à l'objectif de désinfection fixé (e.g. valeur consigne du log d'abattement ou de qualité de 25 désinfection), la dose de désinfectant(s) appliquée audit liquide (e.g. la concentration en chlore libre, en ozone, la dose d'U.V., de température, d'ultra-sons, de rayonnements ionisants) peut être ajustée en conséquence.

Cette augmentation ou diminution de la dose de 30 désinfectant(s) peut se faire en suivant de manière régulière l'évolution du nombre de microorganismes survivants (log d'abattement) à l'aide des indicateurs

enzymatiques ci-avant présentés et cela jusqu'à obtention de l'objectif de désinfection fixé.

L'ajustement de la dose de désinfectant(s) peut également se faire à l'aide de courbes de référence pré-5 établies sur un échantillon dudit liquide représentant le taux de microorganismes survivants, e.g. exprimé en valeurs de log d'abattement, en fonction de la dose de désinfectant(s) appliquée (e.g. doses croissantes de chlore libre, d'ozone, d'U.V., de température ultra-sons, 10 rayonnements ionisants).

De telles courbes de référence permettent de lire les valeurs de doses de désinfectant(s) équivalentes respectivement au taux mesuré et taux désiré de microorganismes survivants tels qu'obtenus à l'aide des 15 indicateurs enzymatiques ci-avant présentés. Il suffit alors d'augmenter ou de diminuer la dose de désinfectant(s) appliquée au liquide contrôlé de la différence lue entre ces équivalents doses de désinfectant(s).

20 De telles courbes de référence peuvent par exemple être obtenues en dénombrant les microorganismes survivants dans un échantillon dudit liquide exposé à des doses croissantes de désinfection (e.g. concentrations croissantes en chlore libre, en ozone, 25 doses croissantes en U.V. de rayonnements ionisants, d'ultra-sons, valeurs croissantes de température).

Le procédé de régulation de la désinfection d'un liquide selon l'invention permet donc, à l'aide de mesures d'activités enzymatiques, de contrôler de manière 30 complète, simple et rapide (moins d'une heure) la désinfection d'un liquide, et cela quel que soit l'état physiologique ou l'identité des microorganismes qui y survivent. Le procédé de régulation de la désinfection

d'un liquide selon l'invention présente de plus l'avantage particulier d'être aisément automatisable, contrairement aux procédés mettant en oeuvre les techniques de microscopies ou de cultures 5 microbiologiques.

Il demeure bien entendu que la présente invention n'est pas limitée aux exemples de réalisation décrits et représentés ci-dessus, mais qu'elle en englobe toutes les 10 variantes. C'est ainsi que notamment les mesures d'activités enzymatiques peuvent être réalisées par des techniques analytiques autres que celles ci-dessus mentionnées.

REVENDICATIONS

1. Procédé de régulation de la désinfection d'un
5 liquide, caractérisé en ce qu'il comprend :

A. à une étape de ladite désinfection ci-après désignée étape 2, la mesure de l'activité d'au moins une enzyme par mise en contact des microorganismes éventuellement présents dans ledit liquide avec un
10 substrat choisi comme étant capable de révéler l'activité de cette ou ces enzyme(s), cette activité enzymatique étant ci-après nommée activité propre,

B. à une étape ci-après désignée étape 1, antérieure à ladite étape 2, la mesure de l'activité de la ou des
15 même(s) enzyme(s) qu'en A, cette activité étant ci-après nommée activité initiale,

C. la traduction, pour chaque enzyme, desdites activité propre et activité initiale, en taux de microorganismes survivants dans le ledit liquide à
20 l'étape 2 de ladite désinfection, et cela par l'intermédiaire d'un système de référence, pré-établi à l'aide d'un échantillon dudit liquide prélevé à ladite étape 1 puis exposé à des doses de désinfectant(s) croissantes, ainsi que

25 D. l'ajustement, en fonction dudit taux de microorganismes survivants, de la nature et/ou des doses du (des) agent(s) chimique(s) ou physique(s) utilisé(s) pour ladite désinfection.

30 2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que ladite étape 1 correspond à une étape avant désinfection dudit liquide et en ce que ladite étape 2 correspond à une étape quelconque de ladite désinfection.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ledit liquide est un liquide destiné à être en contact avec un homme ou un animal tel qu'une eau de baignade, une eau destinée à la 5 consommation, une eau destinée à des préparations pharmaceutiques ou biotechnologiques, ou un liquide alimentaire.

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 1 à 3, caractérisé en ce que ladite mise en contact des microorganismes éventuellement présents dans ledit liquide avec ledit substrat est réalisée par mise en contact dudit liquide ou d'un échantillon dudit liquide avec ledit substrat.

15

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que ladite mise en contact des microorganismes éventuellement présents dans ledit liquide, ou échantillon de liquide, avec ledit substrat 20 est réalisée par mise en contact d'un filtrat, ou d'un culot de centrifugation, dudit liquide ou échantillon de liquide, avec ledit substrat.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 25 1 à 5, caractérisé en ce que ledit liquide, échantillon de liquide, ou concentré, subissent, préalablement auxdites mesures de l'activité d'au moins une enzyme, un traitement de lyse, notamment par sonication.

30

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la ou les enzyme(s) dont la (ou les) activité(s) est (sont) mesurée(s) présente (ent) , dans ledit liquide, échantillon de liquide, ou concentré, un rapport entre activité propre et activité 35 initiale en relation affine, et avec une pente

significativement différente de zéro, préférentiellement inférieure à -0,2, avec le taux de microorganismes survivants sur au moins une zone de valeurs desdits taux de microorganismes survivants.

5

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que la ou au moins une des enzyme(s) dont la (ou les) activité(s) est (sont) mesurée(s) est une glucose-6-phosphate deshydrogénase, 10 une malate déhydrogénase, une glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase, une catalase, une superoxyde dismutase, ou une glutathion reductase.

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 15 1 à 8, caractérisé en ce que lesdites mesures d'activité propre et d'activité initiale sont faites à l'aide d'un spectrophotomètre, d'un spectrofluoromètre, ou d'un luminomètre présentant éventuellement plusieurs canaux d'analyse.

20

10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que ladite traduction en taux de microorganismes survivants à l'aide dudit système de référence comprend, pour chaque enzyme, 25 le calcul du rapport entre activité propre et activité initiale, éventuellement exprimé en pourcentage.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que ledit système de référence se présente sous une forme graphique telle qu'une ou plusieurs courbe(s) mettant, pour chaque enzyme, ledit rapport entre activité propre et activité initiale en relation avec des valeurs de taux de microorganismes survivants.

35

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que lesdites mesures spectrométriques sont réalisées pour chaque activité enzymatique mesurée, à température constante, 5 notamment à 25 °C, et à longueur d'onde constante notamment à une longueur d'onde comprise entre 240 et 550 nm, par exemple à 340 nm.

13. Procédé selon l'une quelconque des 10 revendications 9 à 12, caractérisé en ce que lesdites mesures spectrométriques sont réalisées de manière continue ou discrète sur un intervalle de temps de 30 min environ.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que l'ajustement des doses du (des) agent(s) chimique(s) ou physique(s) se fait par ajout de l'équivalent "dose de désinfectant(s)" correspondant à la différence entre le 20 taux de microorganismes survivants visé et le taux de microorganismes mesuré sur l'édit liquide, échantillon de liquide, ou concentré.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé 25 en ce que l'édit équivalent dose de désinfectant(s) est tel que lu sur une courbe de référence représentant le taux de microorganismes survivants en fonction de la dose de désinfectant(s) à laquelle l'édit liquide est exposé.

16. Procédé selon l'une quelconque des 30 revendications 1 à 15, caractérisé en ce que l'édit liquide comprend des microorganismes choisis parmi le groupe constitué par le genre *Escherichia*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Methylobacterium*, *Pseudomonas*,

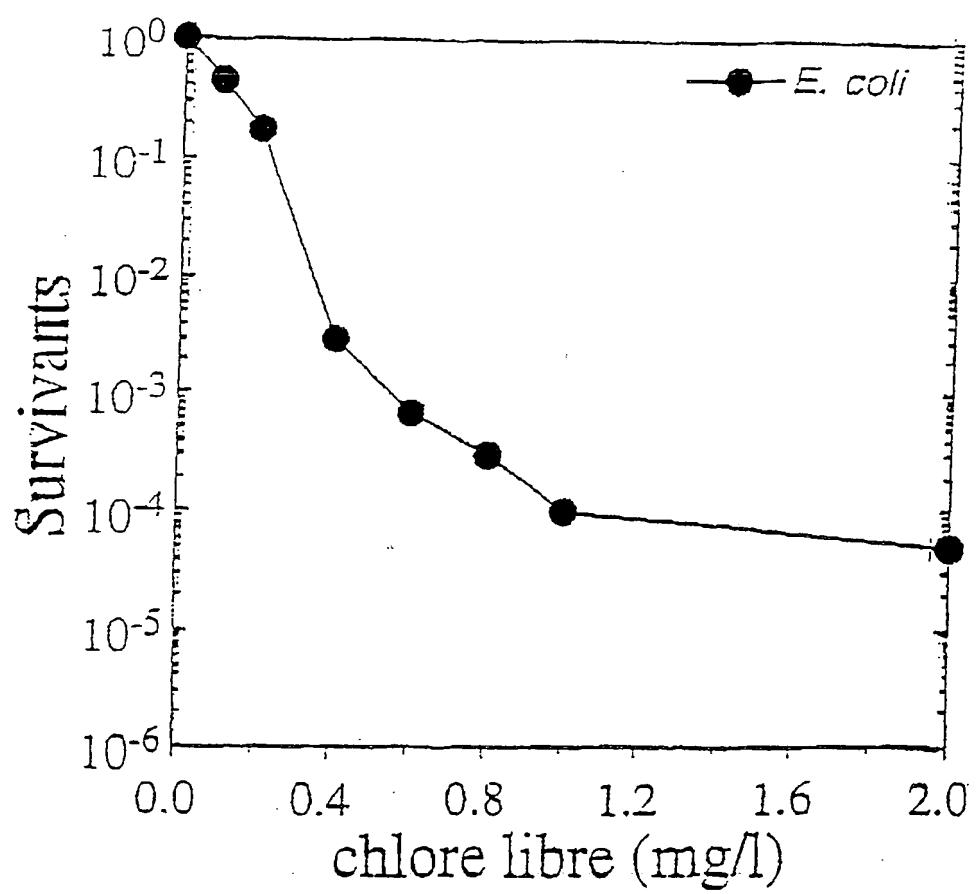
Klebsiella, *Enterobacterium*, *Agrobacterium*,
Streptococcus, *Micrococcus*, *Salmonella*.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce qu'il est automatisé sur un procédé de désinfection de liquide.

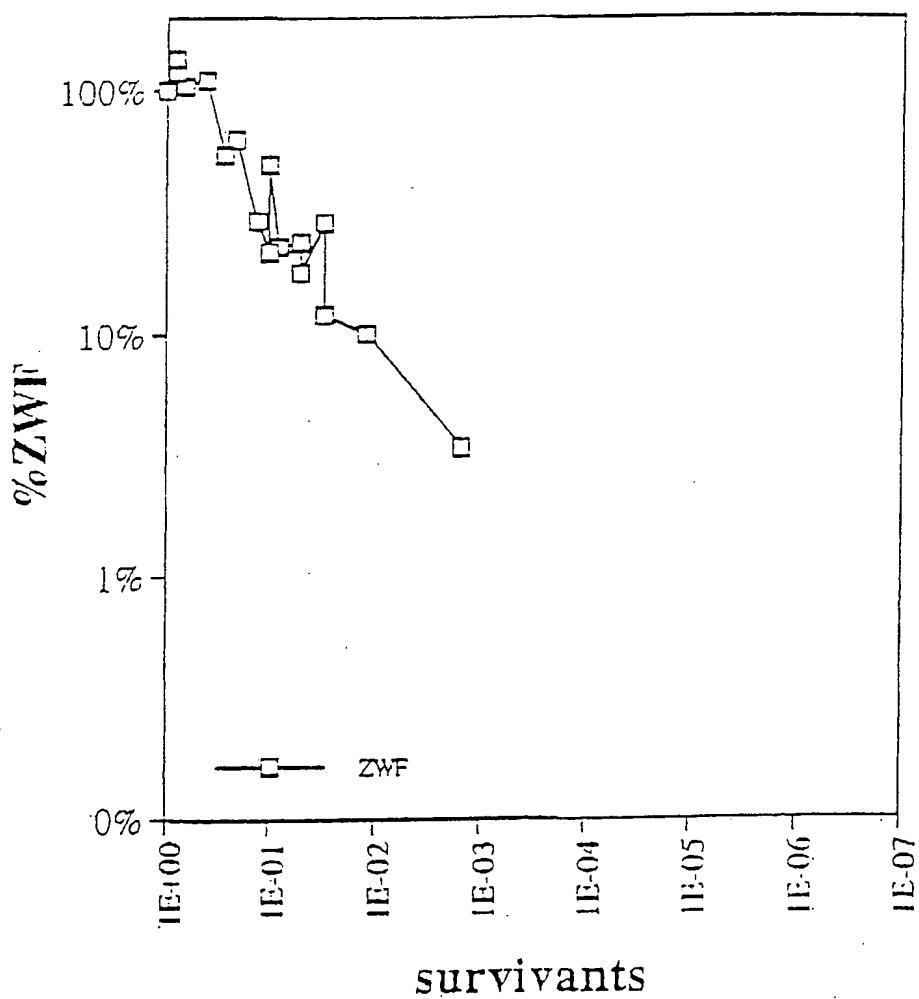
18. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce que ledit taux de microorganismes survivants est exprimé en valeur d'abattement (concentration en microorganismes survivants rapportée à la concentration initiale en microorganismes survivants, telle que mesurée à ladite étape 1, de log d'abattement ($-\log_{10}$ (abattement)) ou d'indice D (= log d'abattement).

19. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que lesdits microorganismes survivants sont des microorganismes cultivables et/ou des microorganismes non cultivables mais viables.

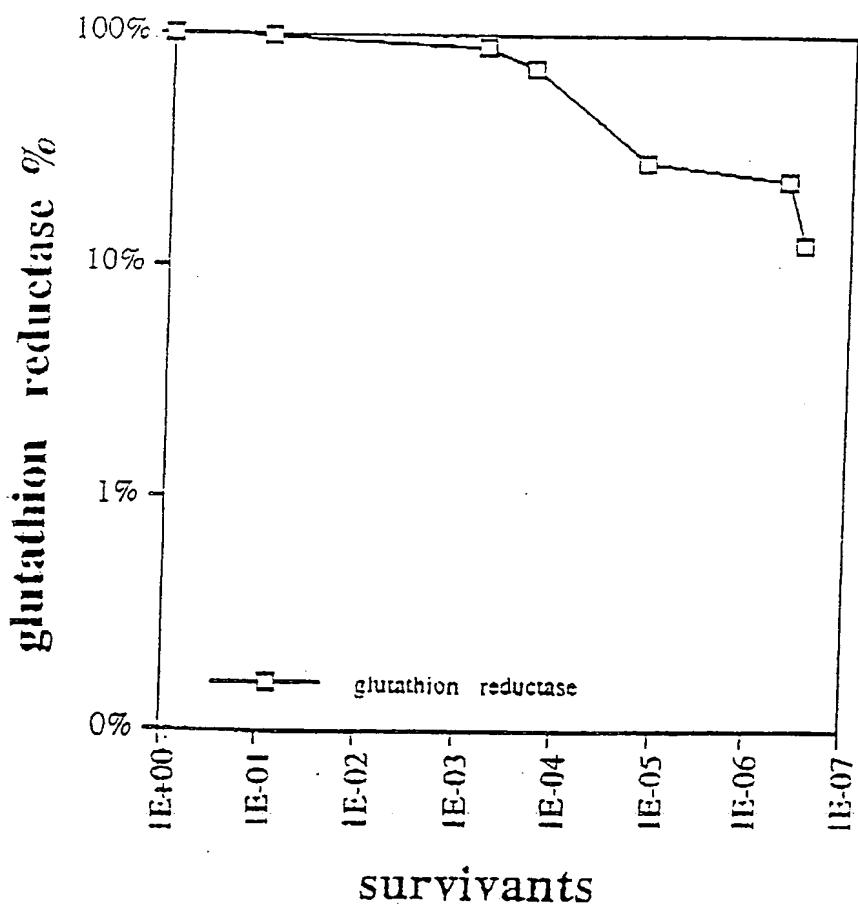
20. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19, caractérisé en ce que lesdits agents chimiques ou physiques utilisés pour la désinfection sont choisis parmi le groupe constitué par le chlore et ses dérivés, les UV, l'ozone, H_2O_2 , les membranes filtrantes, la température, les ultra-sons, les rayonnements ionisants.

Figure 1

2 / 3

Figure 2

3 / 3

Figure 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. onal Application No
PCT/FR 98/02045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12Q1/22 C12Q1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12Q C02F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 223 401 A (FOLTZ WILLIAM E ET AL) 29 June 1993 see the whole document ---	1,2,4,5, 7,9-20
X	US 5 366 872 A (HIRD ROBERT F ET AL) 22 November 1994 see the whole document ---	1,2,4,5, 7,9-20
X	US 5 158 973 A (WHITEKETTLE WILSON K ET AL) 27 October 1992 see the whole document ---	1-4,7, 14-19
X	FR 2 638 170 A (VAR DIFFUSION BACTERIOLOGIE) 27 April 1990 see the whole document ---	1-4,7, 14-19
		-/-



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

*** Special categories of cited documents :**

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 February 1999

Date of mailing of the international search report

18/02/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 98/02045

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>DATABASE WPI Week 9847 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 98-549791 XP002092786 "Method for quantitative determin. of oxidative stress on microorganisms caused by ozone treatment - by determin. of activity or amount of superoxide dismutase in cells of microorganisms, partic. for investigation of bactericidal or bacteriostatic effect" & JP 10 243798 A (MITSUBISHI ELECTRIC CORP), 14 September 1998 see abstract</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>WO 95 08639 A (NORTH AMERICAN SCIENCE ASS) 30 March 1995 see the whole document</p> <p>---</p>	1, 2, 4, 5, 7-20
A	<p>EP 0 574 977 A (BERG JAMES D) 22 December 1993 see the whole document</p> <p>---</p>	1-20
A	<p>US 5 223 402 A (ABBAS CHARLES A ET AL) 29 June 1993 see the whole document</p> <p>---</p>	1, 2, 4-20
A	<p>R. J. STRETTON, T. W. MANSON: "Some Aspects of the Mode of Action of the Antibacterial Compound Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol)" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, vol. 36, no. 1, March 1973, pages 61-76, XP002067066 see page 64 - page 65</p> <p>-----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 98/02045

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 5223401	A 29-06-1993	NONE		
US 5366872	A 22-11-1994	WO 9521264	A	10-08-1995
US 5158973	A 27-10-1992	CA 2078820	A	21-08-1993
FR 2638170	A 27-04-1990	NONE		
WO 9508639	A 30-03-1995	AU 7878794	A	10-04-1995
		CA 2169546	A	30-03-1995
		EP 0720657	A	10-07-1996
		JP 9503128	T	31-03-1997
		US 5486459	A	23-01-1996
EP 0574977	A 22-12-1993	AT 117378	T	15-02-1995
		AT 147790	T	15-02-1997
		AU 2602488	A	01-06-1989
		DE 3852825	D	02-03-1995
		DE 3852825	T	18-05-1995
		DE 3855762	D	27-02-1997
		DE 3855762	T	07-05-1997
		EP 0386051	A	12-09-1990
		WO 8904372	A	18-05-1989
		US 5518894	A	21-05-1996
		US 5292644	A	08-03-1994
US 5223402	A 29-06-1993	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem : Internationale No
PCT/FR 98/02045

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12Q1/22 C12Q1/04

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12Q C02F

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 223 401 A (FOLTZ WILLIAM E ET AL) 29 juin 1993 voir le document en entier ----	1,2,4,5, 7,9-20
X	US 5 366 872 A (HIRD ROBERT F ET AL) 22 novembre 1994 voir le document en entier ----	1,2,4,5, 7,9-20
X	US 5 158 973 A (WHITEKETTLE WILSON K ET AL) 27 octobre 1992 voir le document en entier ----	1-4,7, 14-19
X	FR 2 638 170 A (VAR DIFFUSION BACTERIOLOGIE) 27 avril 1990 voir le document en entier ----	1-4,7, 14-19
		-/-

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

9 février 1999

18/02/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Hart-Davis, J

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den e Internationale No
PCT/FR 98/02045

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>DATABASE WPI Week 9847 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 98-549791 XP002092786 "Method for quantitative determin. of oxidative stress on microorganisms caused by ozone treatment - by determin. of activity or amount of superoxide dismutase in cells of microorganisms, partic. for investigation of bactericidal or bacteriostatic effect" & JP 10 243798 A (MITSUBISHI ELECTRIC CORP), 14 septembre 1998 voir abrégé ---</p>	1-20
A	<p>WO 95 08639 A (NORTH AMERICAN SCIENCE ASS) 30 mars 1995 voir le document en entier ---</p>	1,2,4,5, 7-20
A	<p>EP 0 574 977 A (BERG JAMES D) 22 décembre 1993 voir le document en entier ---</p>	1-20
A	<p>US 5 223 402 A (ABBAS CHARLES A ET AL) 29 juin 1993 voir le document en entier ---</p>	1,2,4-20
A	<p>R. J. STRETTON, T. W. MANSON: "Some Aspects of the Mode of Action of the Antibacterial Compound Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol)" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, vol. 36, no. 1, mars 1973, pages 61-76, XP002067066 voir page 64 - page 65 -----</p>	1-20

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Document brevet cité au rapport de recherche

Recherche Internationale No

PCT/FR 98/02045

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)			Date de publication
US 5223401	A 29-06-1993	AUCUN			
US 5366872	A 22-11-1994	WO	9521264	A	10-08-1995
US 5158973	A 27-10-1992	CA	2078820	A	21-08-1993
FR 2638170	A 27-04-1990	AUCUN			
WO 9508639	A 30-03-1995	AU	7878794	A	10-04-1995
		CA	2169546	A	30-03-1995
		EP	0720657	A	10-07-1996
		JP	9503128	T	31-03-1997
		US	5486459	A	23-01-1996
EP 0574977	A 22-12-1993	AT	117378	T	15-02-1995
		AT	147790	T	15-02-1997
		AU	2602488	A	01-06-1989
		DE	3852825	D	02-03-1995
		DE	3852825	T	18-05-1995
		DE	3855762	D	27-02-1997
		DE	3855762	T	07-05-1997
		EP	0386051	A	12-09-1990
		WO	8904372	A	18-05-1989
		US	5518894	A	21-05-1996
		US	5292644	A	08-03-1994
US 5223402	A 29-06-1993	AUCUN			